

环境因素对节杆菌株 Ha1 降解阿特拉津效果的影响

魏晓爱, 赵清泉, 周博如* (东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的]明确菌株 Ha1 降解阿特拉津(AT)的最适环境因素。[方法]采用液相色谱法测定降解体系中阿特拉津的残留量。[结果]K⁺和 Mg²⁺对菌株 Ha1 降解阿特拉津有促进作用, Cu²⁺、Cd²⁺等离子则抑制其降解功能的发挥;溶液的缓冲性、pH、温度、供氧方式、反应体系、菌株的浓度和氰尿酸(CA)对菌株 Ha1 降解阿特拉津有影响。[结论]该研究结果为生物修复被阿特拉津污染的水环境奠定了理论基础。

关键词 阿特拉津; *Arthrobacter* sp. Ha1; 降解速率

中图分类号 S451.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)36-13062-04

Effects of Environmental Factors on Atrazine Degradation by *Arthrobacter* sp. Ha1

WEI Xiao-ai, ZHAO Qing-quan, ZHOU Bo-ru* (Forestry School, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective] It was cleared that the optimum environmental factors of strain *Arthrobacter* sp. Ha1 biodegrading atrazine. [Method] The atrazine residue in the system was determined with liquid chromatography. [Result] Atrazine biodegradation was significantly promoted by the addition of K⁺ or Mg²⁺ and significantly restrained by the addition of positive ion such as Cu²⁺ and Cd²⁺. The atrazine degraded by strains Ha1 was affected by metal ion, pH, temperature, oxygen, cell concentrations and cyanuric acid. [Conclusion] The results laid the theoretical foundation for bioremediation of atrazine contamination in the water environment.

Key words Atrazine; *Arthrobacter* sp. Ha1; Degradation rate

阿特拉津(C₈H₁₄ClN₅, Atrazine, 简称 AT), 又名莠去津, 化学名称为 2-氯-4-乙胺基-6-异丙胺基-1,3,5-三嗪, 是一种半衰期长的三嗪类除草剂^[1]。因其可移动性强, 在河流、地下水、地表水中常常可以检测出阿特拉津的存在^[2]。每年有 2 百万~3 百万人在饮用被阿特拉津污染的水^[3]。欧洲委员会在有关饮用水的规定中明确指出^[4]: 任何农药在饮用水中的含量不可超过 0.1 μg/L。1998 年我国规定 I、II 类地表水中阿特拉津的标准为 3.0 μg/L^[5-7], 而实际上我国淮河的 4 个监测点的阿特拉津含量都在 81.3 μg/L 以上^[8]。因阿特拉津对人畜危害大, 所以控制和治理阿特拉津的污染是世界各国期待解决的问题。可以通过化学方法修复阿特拉津的污染, 而生物降解的方法因对环境的二次污染小而受到人们的广泛关注^[9-10]。为此, 笔者研究了从土壤中获得阿特拉津高效降解菌 *Arthrobacter* sp. Ha1 在低营养条件下的降解特性及与环境因素的关系, 旨在为利用 Ha1 菌株修复被阿特拉津污染的水体提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种。阿特拉津降解菌 *Arthrobacter* sp. Ha1 (简称 Ha1), 由东北林业大学森林病虫害生物学国家林业局重点实验室分离及鉴定。

1.1.2 试剂与药剂。阿特拉津原药由辽宁省营口市三征农药厂惠赠; 除氰尿酸和阿特拉津标准样品购自西格玛公司外, 其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基。LB 培养基 (LB): 1 L 去离子水中含 NaCl 10.0 g、酵母提取物 5.0 g、胰蛋白胨 10.0 g。微量元素: Mn-

SO · H₂O 1.00 g、FeSO₄ · 7H₂O 1.00 g、H₃BO₄ 0.10 g、Na-MoO₄ · 2H₂O 0.25 g、ZnCl₂ 0.25 g、CuCl₂ · 2H₂O 0.25 g、Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0.25 g、NH₄NO₃ 0.10 g、NiSO₄ · 6H₂O 0.10 g、浓 H₂SO₄ 5 ml, 定容至 1 000 ml。基础盐培养基 (BSM): KH₂PO₄ 0.45 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.20 g、NaCl 0.40 g、K₂HPO₄ 1.79 g、微量元素 1 ml、pH7.5, 定容至 1 000 ml。

1.1.4 仪器。Ultrospec 4200 pro 型分光光度计; ER-52A 型旋转蒸发仪; Waters 2695 型液相色谱仪。

1.2 方法

1.2.1 残留阿特拉津的检测。萃取反应体系中的阿特拉津 (培养液与三氯甲烷的比例为 10:1, V/V), 旋转蒸发仪蒸干提取液, 色谱甲醇溶解稀释残留物后用 HPLC 检测。检测条件: Waters 2996 紫外检测波长为 216 nm; 柱温 25 °C; 流动相为水-甲醇 (20:80, V/V); 进样量 5 μl; 流速为 1 ml/min; 250 mm × 416 mm C₁₈ 不锈钢色谱柱。阿特拉津保留时间为 1.68 min。以已知浓度的阿特拉津标准样品的吸收值做标准曲线, 求待测阿特拉津的浓度。

1.2.2 菌液的制备及 Ha1 对阿特拉津的降解条件。

1.2.2.1 菌液的制备。LB 培养基中接种菌株 Ha1, 150 r/min、30 °C 下摇培 48 h, 5 000 r/min 离心 10 min, 用灭菌的生理盐水洗涤 2 次, 悬浮于磷酸钾缓冲液 (50 mmol/L, pH7.0) 中, 保存于 4 °C 冰箱, 备用。

1.2.2.2 Ha1 对阿特拉津的降解条件。阿特拉津降解体系: 0.5 g/L 阿特拉津的 MgCl₂ 溶液, 接种浓度 1.0 × 10⁷ 个/ml, 150 r/min、28 °C 下摇床振荡培养, 设不加菌液的处理为空白对照, 每 4~6 h 检测其降解情况 (如无特殊说明, 试验皆采用该反应体系)。环境条件对阿特拉津降解速率的影响: ①金属离子。以 0.5 g/L 阿特拉津的去离子水为降解体系, 加入 Mg²⁺、Fe²⁺ 等 14 种不同的金属离子, 加入菌液使终浓度为 1.0 × 10⁷ 个/ml。②pH 的影响。配制不同 pH 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液和非缓冲液 (NaOH-HCl 溶液) (pH 为 6.0 到

基金项目 国家高科技发展计划项目 (2013AA102701); 中央高校基金项目 (DLI2CA16)。

作者简介 魏晓爱 (1990-), 女, 甘肃武威人, 硕士研究生, 研究方向: 植物抗逆性。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事生物降解研究。

收稿日期 2014-11-11

11.0),加菌液和阿特拉津。③反应体系的影响。用含 0.5 g/L 阿特拉津 $MgCl_2$ 和 BSM 2 种体系,加入菌液使终浓度为 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 个/ml,定期检测 Ha1 降解情况。④初始 Ha1 菌液浓度的影响。在 $MgCl_2$ 溶液中分别加入菌液,使终浓度为 0 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 个/ml,定期测定阿特拉津的含量。⑤氧气的影响。设置摇床振荡(150 r/min)、静置、充氮静置和充氧静置 4 种供氧培养方式,分别加入菌液使终浓度为 1.0×10^7 个/ml,5 d 后测定降解率。⑥温度的影响。在含 0.5 g/L 阿特拉津的 $MgCl_2$ 和 BSM 液体中加入菌液,使终浓度为 1.0×10^7 个/ml,分别置于 4、20、25、30、37、45 °C 摇床中摇培,72 h 后测定阿特拉津的降解率。⑦氰尿酸的影响。 $MgCl_2$ 溶液中含有 1 g/L 阿特拉津、氰尿酸和阿特拉津 + 氰尿酸的混合液,定期检测阿特拉津的含量。

2 结果与分析

2.1 金属离子对降解的影响

许多金属离子作为辅基、促进因子、抑制因子等参与酶的催化活动^[11],微生物降解有机污染物的能力与金属离子密切相关^[12-13]。由表 1 可知,在降解过程中,菌体自身或者由菌体产生的阿特拉津降解酶可能对某些金属离子格外“敏感”, Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 等离子对菌株 Ha1 降解阿特拉津有抑制作用。其中 Cu^{2+} 离子的抑制作用最明显,在 0.1 $\mu mol/L$ 时,降解速率仅为 1.940 mg/(L·h),而对照为 3.780 mg/(L·h)。 K^+ 、 Mg^{2+} 等离子对菌株 Ha1 降解阿特拉津具有明显的促进作用,其中 Mg^{2+} 离子促进作用最显著,1.0 mmol/L 浓度时降解速率达 11.310 mg/(L·h),是对照的 3 倍。对比分析 K^+ 、 Mg^{2+} 离子在 0.1、1.0、10.0 mmol/L 时 Ha1 降解阿特拉津的效果,1 000.0 $\mu mol/L$ 是促进菌株 Ha1 降解阿特拉津的最佳浓度。

2.2 pH 和温度对降解的影响

以非缓冲液及磷酸盐缓冲液为反应体系,测定了 pH 与降解速率的关系及缓冲体系对降解的影响(图 1)。在非缓冲液和磷酸盐缓冲液 2 种溶液中菌株 Ha1 对阿特拉津的降解速率均表现出随着 pH 的增加而先增加后减小的趋势,分别在 pH7.5 和 7.0 时达到最大值,但在缓冲溶液中的最大降解速率仅为 1.380 mg/(L·h),而在非缓冲溶液中的最大降解速率为 6.30 mg/(L·h),两者相差 3.44 倍,表明缓冲溶液对菌株 Ha1 降解阿特拉津具有一定的抑制作用。余冰宾报道^[14]磷酸盐缓冲液会抑制某些生物化学过程,如对某些酶的催化作用会产生某种程度的抑制。该研究的结论与其一致。在磷酸盐缓冲溶液中菌株 Ha1 的最适降解 pH 为 8.0,而在非缓冲溶液中的最适降解 pH 为 9.0。温度对菌株 Ha1 的降解率具有显著影响。菌株 Ha1 在 BSM 反应体系中,最适降解温度范围为 25~37 °C,72 h 的降解率可达 99.55%;而在 $MgCl_2$ 反应体系中最适降解温度为 25 °C,72 h 的降解率为 72.73%。37 °C 时, $MgCl_2$ 反应体系抑制菌株 Ha1 对阿特拉津的降解,但 BSM 反应体系中由于营养成分利于细胞的生长繁殖,新生细胞产生的大量水解酶弥补了高温抑制菌体降解能力的下降,使其降解率仍达 99.92%(图 2)。

表 1 金属离子对 Ha1 降解速率的影响

金属离子	离子浓度 $\mu mol/L$	AT 降解速率 mg/(L·h)	金属离子	离子浓度 $\mu mol/L$	AT 降解速率 mg/(L·h)
CK	0	3.780	Cd^{2+}	10.0	1.865
				1.0	3.540
				0.1	3.720
Ba^{2+}	10.0	3.660	Co^{2+}	10.0	1.698
	1.0	3.857		1.0	3.250
	0.1	3.840		0.1	3.504
Na^+	10.0	3.770	Mn^{2+}	10.0	4.410
	1.0	3.720		1.0	4.130
	0.1	3.690		0.1	3.820
Fe^{2+}	10.0	4.090	Ca^{2+}	10.0	4.000
	1.0	3.990		1.0	3.840
	0.1	3.790		0.1	3.800
Zn^{2+}	10.0	3.770	Cu^{2+}	10.0	0.940
	1.0	3.930		1.0	1.830
	0.1	3.580		0.1	1.940
Li^+	10.0	3.790	Mg^{2+}	1 000.0	11.310
	1.0	3.140		10.0	6.000
	0.1	3.040		1.0	5.920
				0.1	4.610
Pb^{2+}	10.0	4.020	K^+	1 000.0	5.360
	1.0	4.140		10.0	5.230
	0.1	2.950		1.0	5.100
				0.1	4.980
Ni^+	10.0	1.840			
	1.0	2.860			
	0.1	3.200			

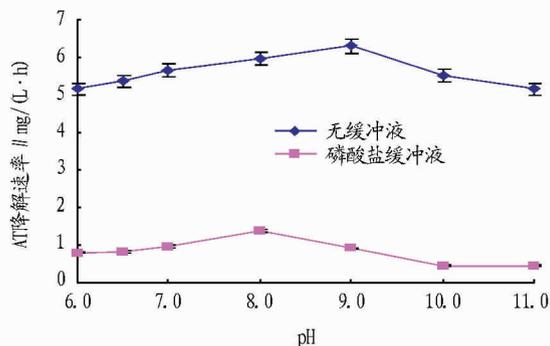


图 1 pH 对 Ha1 降解速率的影响

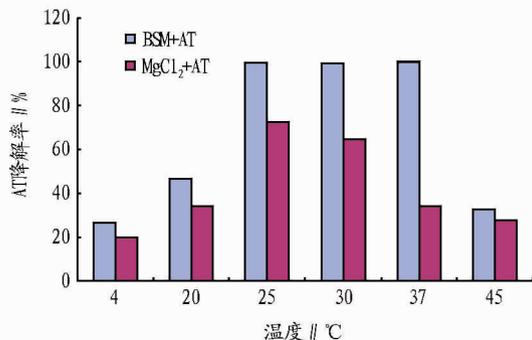


图 2 温度对 Ha1 降解率的影响

2.3 反应体系及 Ha1 菌液浓度对降解的影响

为探索反应体系对降解的影响,分别在 BSM 培养液和 $MgCl_2$ 溶液中加入

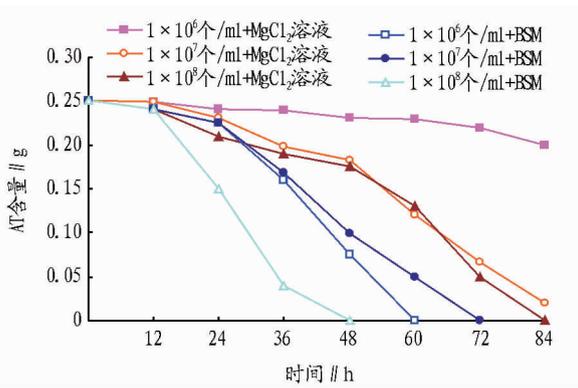


图3 Hal 在不同体系中对降解的影响

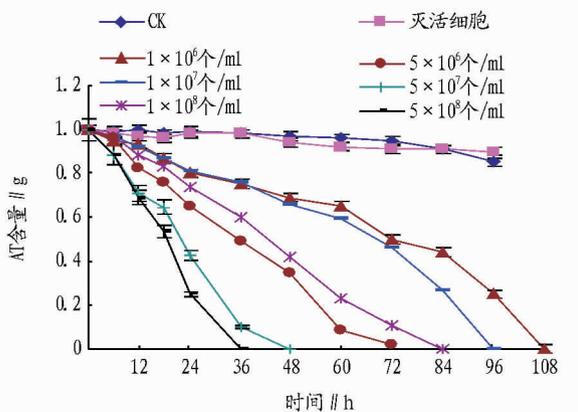


图4 不同 Hal 细胞浓度对降解的影响

1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 个/ml 3 种浓度的菌悬液,结果表明,BSM 降解体系在相同条件下优于 $MgCl_2$ 体系。 $MgCl_2$ 溶液中 96 h 的 Ha1 降解率为 20% ~ 100%,且 Ha1 菌体数量基本未增加;而 BSM 培养液中 3 种浓度的阿特拉津降解率均达 100% 仅需 72 h,且随着菌液浓度的增大降解时间缩短(图 3)。

一般来说,微生物对有机污染物的降解效果与自身的密度和活性有关^[13]。Ha1 在细胞灭活和 6 种浓度下对阿特拉津的降解表明,Ha1 菌体在 $0 \sim 5 \times 10^8$ 个/ml 浓度范围内,对阿特拉津的降解速率随浓度的升高而加快,浓度为 5×10^8 个/ml 时降解 1 g/L 的阿特拉津只需要 36 h,表明 Ha1 对阿特拉津具有很强的降解能力,而灭活细胞几乎没有降解能力(图 4)。进一步研究表明,当细胞浓度大于 5×10^8 个/ml 时,随细胞浓度的增加降解速率并不增加。

2.4 氧气及氰尿酸对降解率的影响 为探索氧气与 Ha1 降解率的关系,测定了不同供氧条件下的 Ha1 降解率。由图 5 可知,当反应体系中充满氮气时,由于缺乏氧气阿特拉津几乎未被降解,说明 Ha1 对阿特拉津的降解过程需要氧气的参与。Ha1 静息细胞在加氧静止和空气供氧条件下对阿特拉津的降解率无显著差异,表明自然供氧完全能够保障 Ha1 降解力的发挥。在摇床自然供氧过程中,可能由于培养液的摇动增加了酶与底物的接触机率,使 Ha1 对阿特拉津的降解达到较高的水平。氰尿酸是阿特拉津降解过程中的中间产物^[11],在降解过程中氰尿酸的累积必然会影

响阿特拉津的降解。结果表明,菌株 Ha1 既可以降解阿特拉津,也可以降解氰尿酸,降解氰尿酸的速度快于阿特拉津,同样是 1 g/L,降解氰尿酸仅为 36 h,而降解阿特拉津则需要 72 h。菌株 Ha1 在外源氰尿酸存在的条件下,降解 1 g/L 的阿特拉津需 84 h,表明外源氰尿酸抑制了阿特拉津的降解(图 6)。

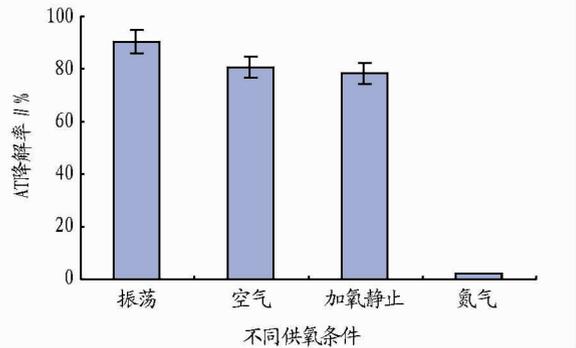


图5 不同供氧条件下的降解效率

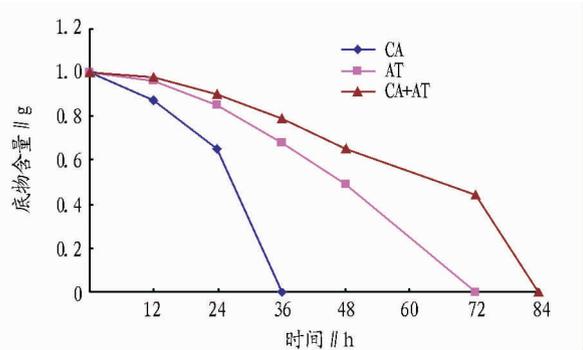


图6 中间产物对降解的影响

3 讨论

生物对阿特拉津降解的实质是其合成酶对阿特拉津的降解,酶作为生物产生的催化剂能催化各种生物化学反应,其反应速度不仅受到酶和底物浓度的影响,同时也和温度、pH、激活剂和抑制剂有关。蔡宝立等报道在阿特拉津降解过程中有 3 种关键酶:①阿特拉津水解酶(简称 AtzA),该酶催化阿特拉津水解脱氨反应产生羟基阿特拉津,是一种功能性的金属酶^[11];②羟基阿特拉津乙胺基水解酶(简称 AtzB),具有催化羟基阿特拉津脱酰胺基反应而产生 N-异丙基氰尿酸胺;③N-异丙基氰尿酸胺异丙基水解酶(简称 AtzC),是一种具有转化 N-异丙基氰尿酸胺生成氰尿酸和异丙胺功能的酶。该研究对金属离子的测定结果表明, K^+ 和 Mg^{2+} 对 Ha1 降解阿特拉津具有促进作用,而 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 等具有抑制降解的作用,据此推测 AtzA 在 Mg^{2+} 和 K^+ 的存在下其活性得到提高,但 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 等离子对 Ha1 降解阿特拉津的抑制机制尚不清楚,具体影响哪种酶的活性有待于进一步研究。另外,在未加任何金属离子的情况下,对照降解速率仍可达 $3.780 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$,其结果与 AtzA 的特点看似不符。但由于 Ha1 悬浮于磷酸钾缓冲溶液中, K^+ 离子的存在可能使降解酶活性得以充分发挥。Ha1 对阿特拉津的降解需要氧的参与,在厌氧的条件下,酶的活性几乎完全受到抑制,这一点符合单

加氧酶的特性。

胡江等^[15]报道阿特拉津降解菌 *Exiguobacterium* sp. 在基础盐培养基中的最适降解温度范围为 25 ~ 30 °C; 代先祝等^[15]报道了 *Pseudomonas* sp. 在基础盐培养基中的最适降解温度区间在 37 ~ 42 °C, 该研究中所使用的降解菌 *Arthrobacter* sp. Hal 无论是在 BSM 中还是在营养贫瘠的 MgCl₂ 体系中, 20 ~ 45 °C 都具有良好的降解效果。在营养贫瘠的 MgCl₂ 体系中 45 °C、72 h 的降解率仍可达到 40%, 表明该菌株在修复营养贫瘠的地下水污染方面将具有良好的应用前景。

Strong 等^[17]把来自假单胞菌 ADP 菌株的 *atzA* 基因转入大肠杆菌, 构建了工程菌株后用灭活细胞进行了土壤修复, 56 d 内土壤中阿特拉津降解率为 52%。胡江等^[18]利用微小杆菌属 (*Exiguobacterium* sp, BTAH1) 和节杆菌属 (*Arthrobacter* sp, AG) 降解菌生长细胞修复被阿特拉津污染的土壤, 8 d 后土壤中阿特拉津的降解率分别达 96.9% 和 96.4%。该研究中 *Arthrobacter* sp. Hal 在细胞浓度达到 1 × 10⁸ 个/ml 时仅 48 h BSM 体系中的阿特拉津降解率就可达 100%, 而营养贫瘠的 MgCl₂ 溶液中降解 0.5 g/L 的阿特拉津也只需 84 h, 说明该菌株具有更强的降解能力。

在该试验选择的细胞浓度和 MgCl₂ 溶液降解体系未观察到生物量增加, 细胞基本上处于静息状态。菌株 Hal 静息细胞能降解阿特拉津和氰尿酸的混合物, 但氰尿酸在一定程度上抑制 Hal 对阿特拉津的降解。氰尿酸作为阿特拉津降解的中间产物, 氰尿酸的降解是由 AtzD 酶来完成的^[11]。Hal 静息细胞成功降解阿特拉津为固定化细胞大规模降解阿特拉津奠定了基础。

参考文献

[1] 任登洲, 高小朋, 贺晓龙, 等. 阿特拉津降解菌的筛选及降解性能研究[J]. 江苏农业科学, 2009(5): 306 - 309.

(上接第 13049 页)

[7] 张强, 牟雪娇, 周正义. 洋葱多糖的提取及抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 3(1): 134 - 141.

[8] 贾淑珍, 王成忠, 于功明. 香菇多糖脱蛋白工艺的研究[J]. 中国酿造, 2008(5): 24 - 27.

[9] 刘成梅, 付桂明, 涂宗财, 等. 百合多糖提取的影响因素研究[J]. 食品科学, 2002, 23(2): 87 - 89.

[10] 刘成梅, 万茵. 百合多糖脱蛋白方法的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 89 - 90.

[11] 王钦德, 杨坚. 食品试验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.

[2] 王东, 冬田芹, 赵继红. 环境水体中痕量阿特拉津的检测[J]. 北方工业大学学报, 2004, 16(3): 32 - 36.

[3] KLIGERMAN A D, DOERR C L, TENNANT A H, et al. Cytogenetic studies of three triazine herbicides. invitro studies[J]. Mutation Research, 2000, 456(4): 53 - 59.

[4] 苏少泉. 除草剂作用靶标与新品种创制[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 268.

[5] BUSTER H R. Atrazine and others triazine herbicide in lakes and rains in Switzerland [J]. Environmental Science Technology, 1990, 24(1): 1049 - 1058.

[6] FISCHER I T, VEESER A, HOFFMANN R W, et al. Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rain bowtrout [J]. Archives of Environmental Contamination Toxicology, 1991, 20(5): 454 - 461.

[7] KOLPIN D W, SNECK D A, HALLBERG G R, et al. Temporal trends of selected agricultural chemicals in Iowa's groundwater, 1982 - 95: Are things getting better[J]. Environ Qual, 1996, 26(3): 1007 - 1017.

[8] 王子健, 吕怡兵, 王毅, 等. 淮河水体取代苯类污染及其生态污染[J]. 环境科学学报, 2002, 22(3): 300 - 303.

[9] STRONG L C, MCTAVISH H, SADOWSKY M J, et al. Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase [J]. Environmental Microbiology, 2000, 367(2): 91 - 98.

[10] 胡江等, 胡江, 代先祝, 等. 两株降解菌对阿特拉津污染土壤的修复效果研究[J]. 土壤学报, 2005, 42(3): 323 - 328.

[11] 蔡宝立, 黄今勇. 除草剂阿特拉津生物降解研究进展[J]. 生物工程进展, 1999, 19(3): 7 - 10.

[12] NEWCOMBE D A, CROWLEY D E. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(6): 877 - 882.

[13] 陈东之, 陈建孟, 章晶晓, 等. 环境因素对甲基叔丁基醚生物降解的影响研究[J]. 环境科学学报, 2007, 27(9): 1463 - 1469.

[14] 余冰宸. 生物化学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004: 165.

[15] 胡江, 代先祝, 李顺鹏. 阿特拉津降解菌 BTAH1 的分离与鉴定[J]. 中国环境科学, 2004, 24(6): 738 - 742.

[16] 代先祝, 蒋建东, 顾立峰, 等. 阿特拉津降解菌 *Arthrobacter* sp. AG1 降解基因研究[J]. 生物工程学报, 2007, 9(5): 789 - 794.

[17] STRONG L C, ROSENDAHL C, JOHNSON G, et al. *Arthrobacter* sp. TCI metabolizes diverse s-triazine ring compounds [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 5973 - 5980.

[18] 胡江, 代先祝, 李顺鹏. 阿特拉津及其降解菌的使用对土壤微生物群落的影响[J]. 应用生态学报, 2005, 16(8): 1518 - 1522.

[12] 杨林莎, 李玉贤. 苯酚 - 硫酸比色法测定百合多糖的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(8): 704 - 705.

[13] 杨林莎, 李玉贤, 李秋杰. 百合多糖提取 - 纯化工艺优选[J]. 中医研究, 2005, 18(1): 25 - 27.

[14] 陈建民, 彭会明. 胖大海中多糖的成分分析和含量测定[J]. 中药材, 1994(17): 32 - 34.

[15] 黄晓钰, 刘邻涪. 食品化学综合实验[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.

[16] 陈来同. 生化工艺学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2007.

[17] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 轻工业出版社, 1998.